

# FRACCIONAMENTO DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NA ÁGUA DA ALBUFEIRA DO CALDEIRÃO

FRACCIONATION OF THE DISSOLVED ORGANIC MATTER PRESENT IN THE WATER OF THE CALDEIRÃO DAM

**Pedro Rodrigues\*** ([prodriques@ipg.pt](mailto:prodriques@ipg.pt)) e  
**Joaquim Silva\*\***

## RESUMO

Pretende-se extrair e caracterizar quimicamente as fracções de MOD (matéria orgânica dissolvida) presente na água da albufeira do Caldeirão (Guarda, Portugal), nomeadamente nas suas componentes colóide, hidrofóbica e transfílica. A MOD foi concentrada por osmose reversa e as respectivas fracções foram isoladas por diálise e adsorção em resinas do tipo XAD-4 e XAD-8. As fracções colóide, hidrofóbica e transfílica foram isoladas e caracterizadas com recurso a técnicas de espectroscopia UV-Vis, fluorescência molecular e infravermelho. A fracção hidrofílica foi caracterizada por fluorescência molecular. A concentração de MOD foi estimada em 82 mg/100 L de água e a percentagem em massa, das quatro fracções de MOD foi de 37, 25, 16 e 22 %, respectivamente. A fracção coloidal apresenta características estruturais diferentes das outras três e parece ter origem na decomposição das paredes bacterianas. A fracção coloidal é caracterizada pela ausência de estruturas aromáticas, pela elevada massa molecular e por conter N-acetilglucosamina, formada pela oxidação de hidratos e carbono. As outras três fracções apresentam semelhanças entre elas e observa-se uma variação com a seguinte tendência hidrofóbica>transfílica >hidrofílica, nas seguintes propriedades: massa molecular, quantidade de estruturas aromáticas condensadas e complexidade estrutural de grupos funcionais orgânicos.

Palavras-Chave: matéria orgânica dissolvida; caracterização e fraccionamento de MOD; colóides; fracção hidrofóbica; fracção transfílica; fracção hidrofílica.

## ABSTRACT

The objective of this work is extract and characterized the DOM (dissolved organic matter) fractions present in the water of Caldeirão dam (Guarda, Portugal), especially in colloid, hydrophobic and transphilic components. The DOM was concentrated by a reverse osmosis system and the fractions were isolated by a dialysis membrane and adsorption to XAD-4 and XAD-8 resin. Three fractions of DOM, colloid, hydrophobic, and transphilic,

were isolated and characterized through UV-Vis spectroscopy, molecular fluorescence and FT-IR. The hydrophilic fraction was characterized by molecular fluorescence. The DOM concentration was estimated at 82 mg per 100 L of water and the percentage, in mass, for the four fractions was 37, 25, 16 and 22%, respectively. The colloidal fraction has unique structural characteristics and apparently is originated from bacteria wall cells. This fraction is characterized by the absence of no aromatic structures, a relatively high molecular weight and contains N-acetylglucosamines residuals. The other three DOM fractions show similarities and there is a hydrophobic>transphilic>hydrophilic trend for the following properties: molecular weight, quantity of condensed aromatic structures and molecular complexity.

Keywords: DOM fractionation and characterization; colloids; hydrophobic fraction; transphilic fraction; hydrophilic fraction.

\* Licenciado em Bioquímica, mestre em Controlo Químico da Qualidade, e pós-graduação em Qualidade da Água e Controlo da Poluição pela Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Assistente do 1º Triénio (1993-1996), Assistente do 2º triénio (1996-1999), e Equiparado a assistente do 2º triénio (1999-2007) na Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico da Guarda.

\*\* Professor Associado com Agregação no Departamento de Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Autor de mais de cento e setenta comunicações em congressos científicos e de mais de sessenta artigos em revistas internacionais das áreas da Química Ambiental, Química Analítica, Bioquímica, Espectroscopia e Quimiometria.

## 1. INTRODUÇÃO

A matéria orgânica natural (MON), resultante dos produtos da decomposição de restos de plantas e animais, encontra-se extensamente distribuída nos diversos compartimentos ambientais, tais como no solo, na água, e nos sedimentos. O seu tamanho, estrutura, composição química e grupos funcionais podem variar de forma bastante acentuada, de acordo com a sua idade e origem (Gaffney *et al.*, 1996). Esta heterogeneidade da MON constitui uma importante propriedade, pois é responsável pelo transporte de muitos produtos químicos orgânicos e inorgânicos, pela associação com poluentes alterando o seu comportamento, como, por exemplo, a solubilidade de compostos antropogénicos hidrofóbicos ou a formação de complexos com iões metálicos, afectando a biodisponibilidade e a toxicidade dos metais (Gaffney *et al.*, 1996).

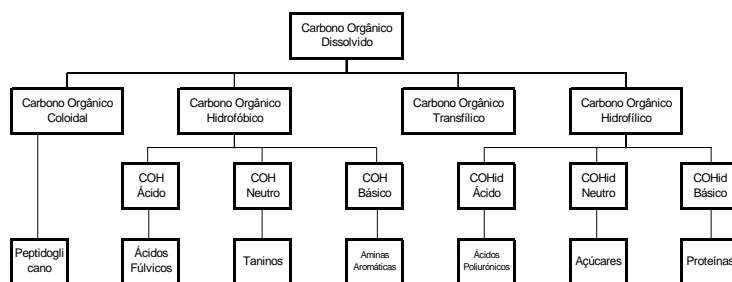


Figura 1 - Fraccionamento da MOD. Adaptado de Leenheer e Croué (2003)

Importantes desafios estão também hoje colocados à indústria do tratamento de águas para consumo humano, onde o principal objectivo passa por compreender e prever a reactividade da matéria orgânica dissolvida (MOD), ou das suas fracções, nos processos específicos do tratamento (desinfecção). Neste caso, a caracterização da MOD presente nas águas ganhou recentemente maior importância devido à necessidade de se conhecer com maior profundidade os factores envolvidos na formação de subprodutos (SPD) durante o processo de desinfecção (Rook, 1976; Rook, 1977; Rodrigues *et al.*, 2007). Neste campo, o fraccionamento da MOD e a sua classificação, apresentadas primeiramente por Leenheer e por Huffman (1976; 1979), e recentemente expandidas (Leenheer *et al.*, 2000), permitiram a

separação em quatro fracções (Figura 1): coloidal, hidrofóbica, transfílica e hidrofílica. Assim, um conhecimento mais profundo de cada uma das fracções da MOD poderá proporcionar novas e mais eficientes abordagens dos processos de tratamento de águas para consumo e permitirá perceber de forma mais clara as propriedades apresentadas pela matéria orgânica no meio ambiente.

Neste artigo apresenta-se o processo de extracção e fraccionamento das quatro fracções de MOD na água da albufeira do Caldeirão, onde é feita a captação para o abastecimento público do concelho da Guarda, e apresentam-se os resultados da sua caracterização com técnicas espectroscópicas (UV-Vis, infravermelho e fluorescência).

## 2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

### 2.1. Extracção, fraccionamento e isolamento da matéria orgânica

Antes do processo de fraccionamento, a água da albufeira (aproximadamente 200 L) foi concentrada num litro com um sistema de osmose reversa (OR), esquematizado na Figura 2. Este sistema é constituído por uma bomba eléctrica da marca Topway Global Inc. (modelo 8821142120, USA), resinas desionizadoras (ATS, Portugal), manómetro de pressão (Precisión, Espanha) e uma coluna de osmose reversa (USA).

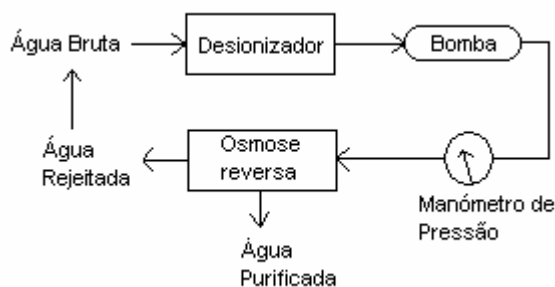


Figura 2 – Sistema de osmose reversa utilizado para a concentração da MOD

No fraccionamento da MOD usou-se o seguinte procedimento:  
i) acidificação da solução concentrada a pH 1 e a sua colocação num saco de diálise (Spectrum, Spectra/Por), com um *cutoff* de 3,5 kDa; ii)

imersão durante 36 horas em 3 x 4 L de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl (Merck) - no saco de diálise ficou retida a fracção coloidal, a qual foi congelada para posterior liofilização. A solução dialisada foi eluída sequencialmente por uma resina não iónica de éster acrílico, XAD-8 (Fluka), e uma resina não iónica de estireno-divenilbenzeno, XAD-4 (Fluka), permitindo obter, por adsorção, as fracções hidrofóbica e transfílica, respectivamente (Figura 3).

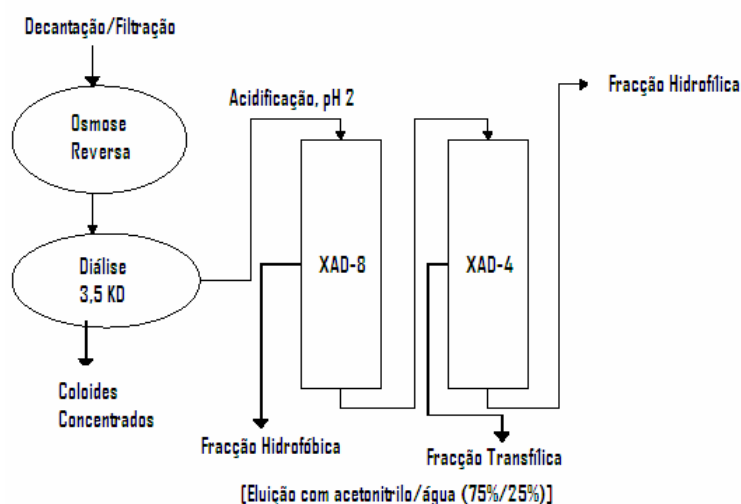


Figura 3 – Esquema relativo ao protocolo de isolamento da MOD  
Adaptado de Croué (2004)

A eluição das fracções hidrofóbica e transfílica, adsorvidas nas resinas XAD-8 e XAD-4, foi efectuada com uma solução aquosa de acetoneitrilo (Merck) a 75%. As soluções com as respectivas fracções foram congeladas e liofilizadas (B. Braun, Christ LDC-1).

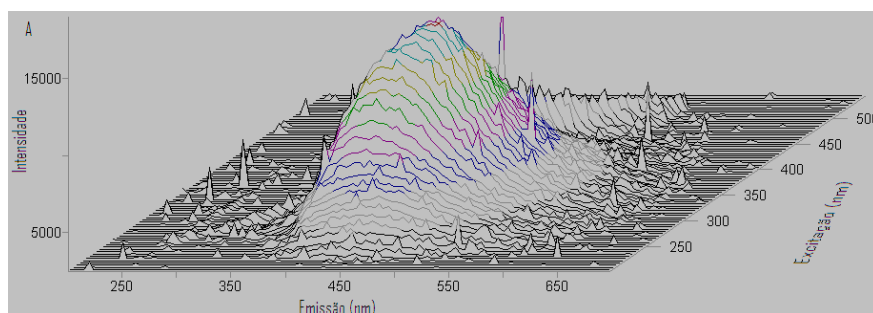
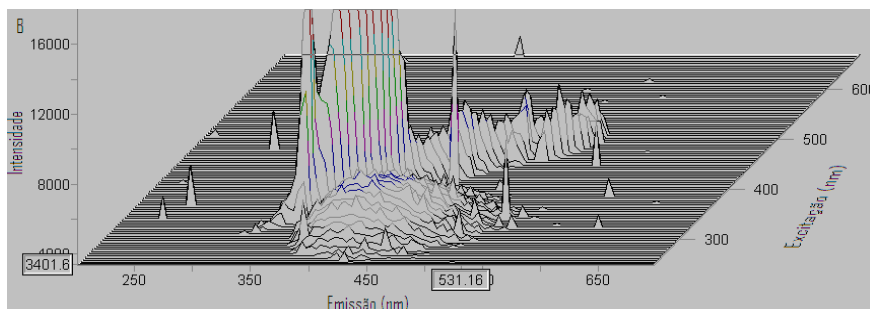


Figura 4A – MEE de fluorescência da solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> resultante do processo de diálise antes da eluição

As figuras 4A e 4B mostram as matrizes de excitação-emissão (MEE) de fluorescência da solução dialisada antes (A) e depois (B) de passar pelas duas resinas. Como as frações hidrofóbica e transfílica ficaram adsorvidas nas resinas, a intensidade de fluorescência da solução, depois de passar pelas colunas, diminuiu porque corresponde apenas à fração hidrofílica (Figura 4.B).



**Figura 4B – MEE de fluorescência da solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> resultante do processo de diálise depois da eluição**

Na amostra estudada, e considerando que a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração em massa das frações, a fração hidrofílica corresponde a 35% das três frações que passaram pelo saco de diálise.

## 2.2. Análise espectroscópica das frações de matéria orgânica

Os espectros UV-Vis de soluções aquosas (20 mg L<sup>-1</sup>) das frações de MOD preparadas em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> (Merck) foram obtidos num espectrofotómetro Hewlett-Packard (modelo 8452A), utilizando uma cuvete de quartzo com 1 cm de percurso óptico (Hellma) e numa gama de comprimento de onda entre 240 e os 800 nm. A aquisição das MEE de fluorescência das mesmas soluções usadas para obter os espectros de UV-Vis, foram efectuadas com um espectralfluorímetro Spex 3D (Horiba, Jobin Yvon), numa gama de comprimentos de onda de excitação entre 200 e 700 nm e de emissão entre 200 e 600 nm, com uma largura de fenda de 0,5 mm, com um tempo de aquisição de 10 segundos e em cuvetes de quartzo de fluorescência com 1 cm de percurso óptico (Hellma).

Os espectros de infravermelho das frações de MOD foram obtidos por reflectância difusa da mistura da cada fração com KBr (Aldrich), e foram adquiridos para números de onda entre os 1000 e os

3500  $\text{cm}^{-1}$  com um espectrofotômetro FTIR da marca Jasco (modelo FT/IR-460 Plus), com a acumulação de 35 espectros e uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Percentagem em massa das fracções de MOD

Na Tabela 1 e na Figura 5 são apresentados os resultados das análises quantitativas das quatro fracções de MOD.

A análise da tabela e da figura mostra que a fracção coloidal é a que se encontra em maior quantidade relativamente às restantes fracções da MOD - cerca de 37%. Relativamente às fracções hidrofóbica, transfílica e hidrofílica, as percentagens são cerca de 25%, 16% e 22%, respectivamente. Para a fracção hidrofílica, a massa e respectiva percentagem foram estimadas a partir das intensidades de fluorescência das amostras dialisadas, antes e depois de passarem pelas resinas XAD-4 e XAD-8, como é descrito na secção 2.1, e das massas obtidas para as fracções hidrofóbica e transfílica.

**Tabela 1 – Massa e razões de massa (relativamente à fracção transfílica) das fracções de MOD obtidas a partir de 200L de água da albufeira da Barragem do Caldeirão**

Fracção	Massa (mg)	Razão de massas*	%**
Colóide	62	2,4	37
Hidrofóbica	41	1,6	25
Transfílica	26	1,0	16
Hidrofílica**	36	1,4	22
Total	165	Concentração $\approx 82,5 \text{ mg}/100 \text{ L}$	

\* Relativa à massa da fracção transfílica.

\*\* Estimativa com base nas intensidades de fluorescência (ver secção 2.1).

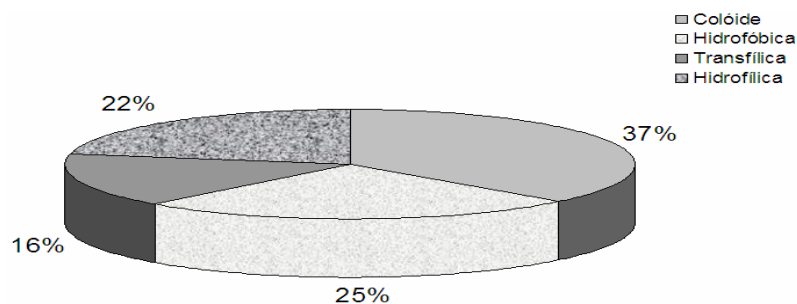


Figura 5 – Percentagem em massa das frações da MOD existentes na água da Albufeira do Caldeirão

### 3.2. Análise por UV-Vis

Na Figura 6 mostram-se os espectros de UV-Vis das frações coloidal, hidrofóbica e transfílica. Para facilitar a comparação entre os três espectros, calcularam-se as razões E2/E4, E4/E6 e absorvâncias a 285nm que se apresentam na Tabela 2. As razões E2/E4 e E4/E6 correspondem, respectivamente, à razão entre as absorvâncias medidas a 265 e 465 nm e a 465 nm e a 665 nm. A razão E4/E6 é independente da concentração das amostras de ácidos fúlvicos e/ou húmicos, e diminui com o aumento da massa molecular e consequente aumento da condensação aromática (Chin, Aiken e Longhlin, 1994, Saab e Martin-Neto, 2007). A absorvância a 285 nm poderá dar uma indicação do grau de humificação - quanto maior for a absorvância maior o grau de humificação (Kalbitz, Geyer e Geyer, 1999).

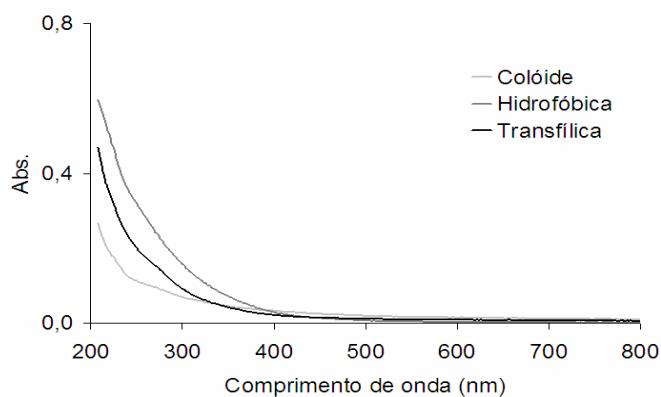


Figura 6 – Espectro UV-Vis das frações coloidal, hidrofóbica e transfílica da MOD

A matéria orgânica apresenta geralmente uma forte absorvância na região do UV-Vis, particularmente na zona do ultravioleta, devido á



presença de cromóforos aromáticos (Schnitzer e Khan, 1972; Traina, Novak e Sneck, 1990; Chin, Aiken e Longhlin, 1994). Os espectros das três frações isoladas evidenciam um comportamento semelhante, verificando-se um decréscimo de absorção à medida que o comprimento de onda aumenta (Figura 6). Apesar de o espectro apresentar uma banda larga, não evidenciando máximos ou mínimos, a absorvância varia com as frações de MOD. Pela análise da Figura 6 e da Tabela 2 (principalmente a absorvância a 285nm), verifica-se que a fração coloidal apresenta uma menor absorvância relativamente às frações hidrofóbica e transfílica, o que sugere que aquela fração possui uma menor quantidade de compostos aromáticos e polifenólicos (colóides < transfílicos < hidrofóbicos).

A análise da Tabela 2 permite verificar que a fração hidrofóbica apresenta o valor maior para as razões E2/E4 e E4/E6, o que leva concluir que esta fração apresenta uma maior massa molecular e maior condensação aromática do que a fração transfílica. Este resultado é esperado porque tanto o aumento da massa molecular como o aumento da condensação aromática levam a um acréscimo das propriedades hidrofóbicas.

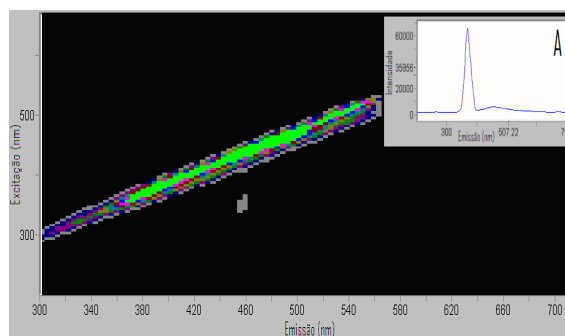
**Tabela 2 – Valores E2/E4, E4/E6, e absorvância a 285 nm para as frações de MOD**

Fração	E2/E4	E4/E6	Abs. 285 nm
Coloidal	4,5	1,7	0,08
Hidrofóbica	26,1	5,0	0,20
Transfílica	12,6	1,9	0,13

No caso da fração coloidal, como não tem uma origem semelhante às das outras frações de MOD (substâncias húmicas), as suas propriedades de UV-Vis não poderão ser interpretadas com os critérios de massa molecular e condensação aromática descritas atrás, porque estas relações foram desenvolvidas para substâncias húmicas de solos e águas (Chin, Aiken e Longhlin, 1994; Saab e Martin-Neto, 2007; Kalbitz, Geyer e Geyer, 1999).

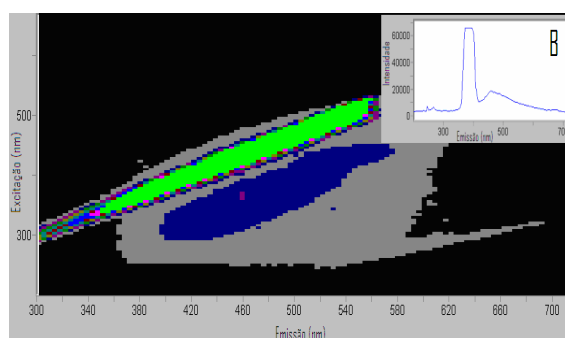
### 3.3. Análise por fluorescência molecular

Os espectros de fluorescência resultam da contribuição de diferentes fluoróforos, principalmente compostos aromáticos, presentes nas frações da MOD. Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas as MEE e espectros de emissão de fluorescência das quatro frações da MOD.



**Figura 7A – MEE e espectro de emissão de fluorescência (janela no canto superior direito) da fracção coloidal com tempo de aquisição de dez segundos (A)**

As MEE da fracção coloidal (Figuras 7A e 7B) são caracterizadas por apresentarem uma banda de dispersão relativamente elevada e por uma fluorescência molecular praticamente inexistente. Este resultado confirma a menor quantidade de compostos aromáticos e polifenólicos desta fracção observada por UV-Vis. Por outro lado, a intensa banda de dispersão deve-se à existência em solução de colóides, que dão origem a um efeito de dispersão de Tyndall.



**Figura 7B – MEE e espectro de emissão de fluorescência (janela no canto superior direito) da fracção coloidal com tempo de aquisição de quarenta segundos (B)**

As Figuras 8A, 8B e 8C apresentam as MEE das fracções hidrofóbicas, transfilicas e hidrofílicas. Estas MEE apresentam uma única banda de emissão caracterizada pelos seguintes comprimentos de excitação (ex.) e de emissão (em.) máximos: hidrofóbica, ex. 332 nm e em. 452 nm; transfílica, ex. 329 nm e em. 438 nm; hidrofílica, ex. 315 nm e em. 420 nm. Observa-se um desvio para maiores energias no comprimento de onda da excitação das fracções de MOD, o que poderá evidenciar uma diminuição da condensação de estruturas aromáticas à medida que as fracções se tornam mais hidrofílicas. Este

resultado confirma o obtido pela análise da razão E4/E6 das frações hidrofóbicas e transfílicas.

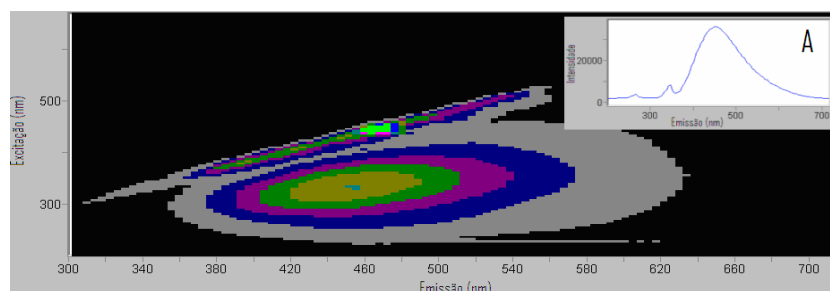


Figura 8A – MEE e espectro de emissão de fluorescência (janela no canto superior direito) da fração hidrofóbica

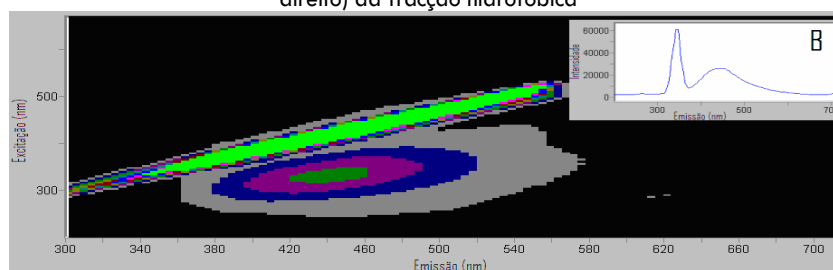


Figura 8B – MEE e espectro de emissão de fluorescência (janela no canto superior direito) da fração transfílica

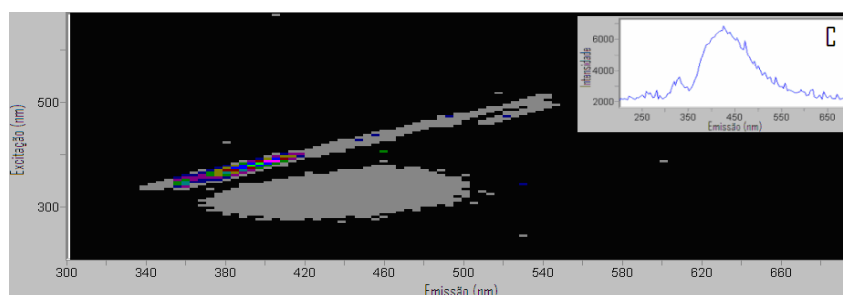


Figura 8C – MEE e espectro de emissão de fluorescência (janela no canto superior direito) da fração hidrofílica

A intensidade máxima da banda de emissão das frações hidrofóbica e transfílica é de 27638 e 18399, respectivamente. Este resultado mostra que a fração hidrofóbica é mais fluorescente que a transfílica, o que traduz uma maior concentração de estruturas aromáticas nas suas moléculas (Chen *et al.*, 2003). Este resultado confirma a maior quantidade de compostos aromáticos e polifenólicos da fração hidrofóbica observada por UV-Vis.

### 3.4. Análise por infravermelho

Os espectros de infravermelho são particularmente úteis na caracterização das frações de MOD, no que diz respeito à existência de grupos funcionais, principalmente os que contêm oxigênio. Na Figura 9 são apresentados os espectros de FTIR das três frações MOD. Uma primeira análise destes espectros mostra diferenças bastante significativas entre eles, o que poderá ser utilizado como uma técnica de impressão digital para a identificação das diferentes frações.

O espectro FTIR da fração coloidal apresenta o seguinte conjunto de bandas características que correspondem aos grupos funcionais: amida primária ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ); amida secundária ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ); grupos hidroxilo (banda larga a cerca de  $3320\text{ cm}^{-1}$ ). A banda localizada a  $1050\text{ cm}^{-1}$  deve-se a grupos CO, e é particularmente importante porque estes grupos são indicadores da presença de N-acetilglucosamina (Croué, 2004), formada a partir da oxidação de hidratos de carbono com grupos amina provenientes da estrutura da parede bacteriana (Hwang *et al.*, 2001; Leenheer, 2004).

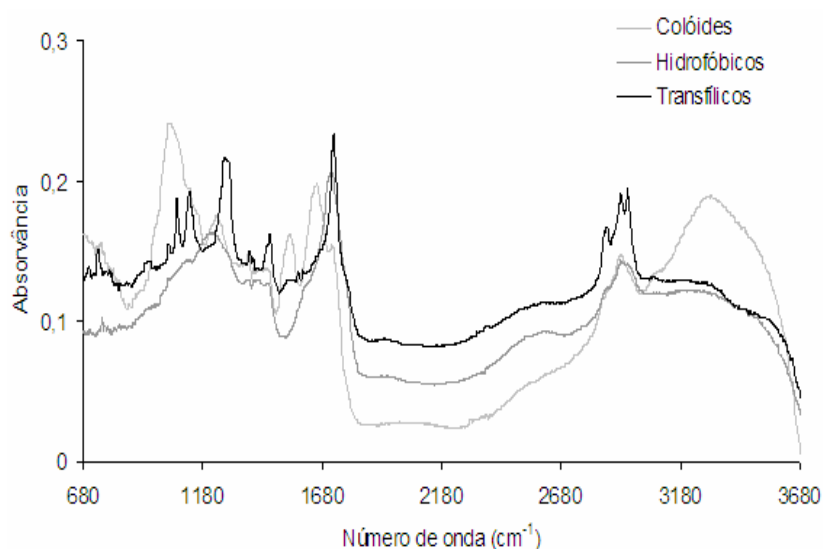


Figura 9 - Espectros de infravermelho das frações de MOD, colóide, hidrofóbica e transfílica

No caso das frações hidrofóbica e transfílica observa-se uma maior intensidade da banda para valores de número de onda próximos de  $1720\text{ cm}^{-1}$ , a qual sugere uma maior abundância de grupos

carbonilo. A comparação dos espectros destas duas fracções, com base em Stevenson (1982), Baddi *et al.* (2004), Sierra *et al.* (2005) e Baglieri *et al.* (2006), mostra que o espectro da fracção transfílica tem um conjunto de bandas bem definidas nos seguintes números de onda:  $2930\text{ cm}^{-1}$  (alongamentos vibracionais simétricos e assimétricos das ligações C-H em grupos metilo e metileno);  $1720\text{ cm}^{-1}$  (alongamentos de grupos C=O principalmente grupos carboxílicos);  $1130\text{ cm}^{-1}$  (vibrações de grupos álcool); e,  $1080\text{ cm}^{-1}$  (associados a alongamentos C-O em polissacarídeos). Por outro lado, o espectro da fracção hidrofóbica não apresenta uma resolução fina e o espectro é semelhante à fracção da MON denominada ácidos fúlvicos (AF) e que está presente abundantemente nos solos e na água (Rodrigues e Esteves da Silva, 2005). Estas amostras de AF e a fracção hidrofóbica serão caracterizadas por uma maior complexidade estrutural, que leva a uma grande mistura de diferentes grupos funcionais, o que não permite obter um espectro de IV com uma resolução fina.

#### 4. CONCLUSÕES

O sistema constituído por um processo de diálise com um *cutoff* de 3,5 kDa em conjugação com duas colunas montadas sequencialmente, uma contendo resina XAD-8 e outra XAD-4, permite obter quatro fracções distintas da matéria orgânica. A análise quantitativa mostra que a MOD presente na água da Albufeira do Caldeirão é maioritariamente composta por colóides (37% em massa), sendo a fracção transfílica (16%) a menos abundante, seguindo a sequência coloidal>hidrofóbica>hidrofílica>transfílica.

A análise qualitativa mostra que a fracção colóide é estruturalmente constituída por N-acetilglucosamina, enquanto que a fracção hidrofóbica apresenta uma massa molecular mais elevada e uma maior presença de grupos aromáticos quando comparada com a fracção transfílica. Por outro lado, o carácter mais hidrofílico da fracção transfílica é acentuado pelo aparecimento de um maior conteúdo de grupos funcionais contendo átomos de oxigénio, como grupos carboxílicos e hidroxílicos, relativamente à fracção hidrofóbica.

No que se refere à qualidade da água resultante do tratamento em ETA, nomeadamente no desenvolvimento de subprodutos da desinfecção (SPD), é de prever que não sendo as fracções colóide e hidrofóbica completamente removidas pelos processos convencionais

de tratamento, estas contribuem para a formação de certas famílias de SPD, induzindo simultaneamente um elevado consumo de cloro (nomeadamente a formação de mono e dicloroaminas). Relativamente às componentes mais hidrofílicas (transfílica + hidrofílica), que são mais solúveis na água, é de prever que estas contribuam de forma mais acentuada para formação dos SPD na água de consumo.

A existência na água de fracções de MOD com propriedades bastante diferentes levanta dois tipos de problemas que poderão afectar a qualidade da água de consumo. O primeiro está relacionado com as operações unitárias da ETA utilizadas para a remoção da MOD e que terão que ser optimizadas para a remoção das fracções mais hidrofóbicas e mais hidrofílicas. Por outro lado, a reacção química entre as substâncias utilizadas na desinfecção e as diferentes fracções de MOD existentes na água poderá dar origem a produtos (SPD) com diferentes toxicidades. Para uma melhor compreensão dos mecanismos que, num determinado local e com um tipo de água, originam certas famílias de SPD, é necessário aumentar os esforços de investigação sobre a caracterização e eliminação das fracções de MOD que são responsáveis pelos SPD mais tóxicos, e que constituem uma fonte de risco para os consumidores de água desinfectada.

## BIBLIOGRAFIA

- Baddi, G. A., *et al.* (2004); "Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw"; *Bioresource Technology*, 93; 285–290.
- Baglieri, *et al.* (2007); "A method for isolating soil organic matter after the extraction of humic and fulvic acids"; *Organic Geochemistry*, 38; 140-150.
- Chen, J., *et al.* (2003); "Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions"; *Chemosphere*, 50; 639–647.
- Chin, Y. P., Aiken, G., Longhlin, E.O. (1994); "Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances"; *Environmental Science & Technology*, 28; 1853-1858.
- Croué, J. F. (2004); "Isolation of humic and non-humic NOM fractions: Structural characterization"; *Environmental Monitoring and Assessment*, 92; 193–207.
- Gaffney, J. S., Marley, N. A., Clark, S. B. (1996); *Humic and Fulvic Acids*; ACS; Washington (USA).
- Hwang, C. J., *et al.* (2001); "Polar NOM: Characterization, DBPs, Treatment"; project 451; American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association; USA.
- Kalbitz, K., Geyer, W., Geyer, S. (1999); "Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area", *Biogeochemistry*, 47; 219-238.

- Leenheer J. A., Huffman E. W. D. (1976); "Classification of organic solutes in water by using macroreticular resins"; *Journal of Research U.S. Geological Survey*, 4; 737-751.
- Leenheer J. A., Huffman E. W. D., (1979); "Analytical method for dissolved organic carbon fractionation"; *U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigation*, 16; 79-84.
- Leenheer, J. A. (2004); "Comprehensive assessment of precursors, diagenesis, and reactivity to water treatment of dissolved and colloidal organic matter"; *Water Science and Technology*, 4; 1-9.
- Leenheer, J. A., Croué, J.P. (2003); "Characterizing dissolved aquatic organic matter" *Environmental Science & Technology*, 37; 18A-26A.
- Leenheer, J., et al.. (2000), "Comprehensive Isolation of Natural Organic Matter from Water for Spectral Characterizations and Reactivity Testing" in Barret, S., Krasner, S. W., and Amy, G. L., eds., *Natural organic and disinfection by-products*, American Chemical Society Symposium Series 761, 68-83, Washington, USA.
- Rodrigues, P.M.S.M., Esteves da Silva, J.C.G. (2005); "Caracterização de Ácidos Fúlvicos da Água da Albufeira do Caldeirão (Guarda) e dos Solos Adjacentes"; *Revista de Ciências Agrárias*, 28, 218-227.
- Rodrigues, P.M.S.M., Esteves da Silva, J.C.G., Antunes, M.C.G. (2007); "Factorial analysis of the trihalomethanes formation in water disinfection using chlorine"; *Analytica Chimica Acta*; 595; 266-274.
- Rook, J. (1976); "Haloform in drinking water", *Journal of American Water Works Association*, 68, 1976, 168-172.
- J. Am. Water Works Assoc., 68, 168-172.
- Rook, J. (1977); "Chlorination reactions of fulvic acids in natural waters"; *Environmental Science & Technology*, 11; 478-482.
- Saab, S. C., Martin-Neto, L. (2007); "Anéis aromáticos condensados e relação E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>: Estudo de ácidos húmicos de gleissolos por RMN de <sup>13</sup>C no estado sólido utilizando a técnica CP/MAS desacoplamento defasado"; *Química Nova*, 30; 260-263.
- Schnitzer, M., Khan, S.N., (1972) *Humic substances in environment*, Marcel Dekker, New York (USA).
- Sierra, M. M. D., et al. (2005); "Structural description of humic substances from subtropical coastal environments using elemental analysis, FT-IR and <sup>13</sup>C-solid state NMR data", *Journal of Coastal Research*, 42; 370-382.
- Stevenson, F.J. (1982); *Extraction, fractionation and general chemical composition of soil organic matter. Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*, John Wiley and Sons, New York (USA).
- Traina, S.J., Novak, J., Sneck, N.E. (1990); "An Ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids"; *Journal of Environmental Quality*, 19; 151-153.